

⑤

Int. Cl. 2:

C 07 G 7/02

①

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

Behördeneigentum

⑪

Offenlegungsschrift

25 51 017

⑫

Aktenzeichen:

P 25 51 017.2-41

⑬

Anmeldetag:

13. 11. 75

⑭

Offenlegungstag:

7. 10. 76

⑮

Unionspriorität:

⑮ ⑯ ⑰

31. 3. 75 USA 564966

⑱

Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung von Urokinase

⑲

Anmelder:

Abbott Laboratories, North Chicago, Ill. (V.St.A.)

⑳

Vertreter:

Abitz, W., Dr.-Ing.; Morf, D., Dr.; Brauns, H.-A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Pat.-Anwälte, 8000 München

㉑

Erfinder:

Lewis, L. James, Iowa City, Ia. (V.St.A.)

Prüfungsantrag gem. § 28b PatG ist gestellt

DT 25 51 017 A 1

DT 25 51 017 A 1

4/24

DR.-ING. WALTER ABITZ
DR. DIETER F. MORF
DR. HANS-A. BRAUNS

Patentanwälte

Patentanwälte Dres. Abitz, Morf, Brauns
8 München 88, Postfach 860 109

München, 13. November 1975

Postanschrift / Postal Address
8 München 88, Postfach 860 109

Plenzenauerstraße 28

Telefon 98 32 22

Telegramme: Chemindus München

Telex: (0) 5 23992

.3216

2551017

ABBOTT LABORATORIES
North Chicago, Illinois, V.St.A.

Verfahren zur Herstellung von Urokinase

Es ist seit etwa 1951 bekannt, daß Urokinase die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin bewirkt. Aufgrund dieser Fähigkeit hat die Verbindung als Aktivator, welcher die Auflösung von Blutgerinnseln bzw. -klumpen fördert, Verwendung gefunden. Eine zur Auflösung eines Blutgerinnsels befähigte Einzeldosis erfordert jedoch einen ziemlich hohen Anteil an Urokinase, welche bis 1962 hauptsächlich aus Harn extrahiert wurde. Seitdem wurde die Urokinase aus in geeigneten Nährmedien gezüchteten Kulturen von Nierenzellen verschiedener Tiere erzeugt. Die auf diese Weise erhaltene Urokinase ist von der früher verwendeten, aus Harn hergestellten Substanz in immunologischer Hinsicht ununterscheidbar. Nierenzellen können jedoch vor ihrem Einsatz zur Herstellung von Urokinase zwar im Großmaßstab propagiert werden, die Urokinasesynthese ist jedoch auch in diesem Falle kostspielig und aufgrund des bei dieser Methode erforderlichen Raumbedarfs nur innerhalb bestimmter Grenzen möglich.

- 1 -

609841/0964

Mit dem Ziel, genügende Mengen des Wirkstoffs für die Bekämpfung von Blutgerinnseln in der Humanmedizin zur Verfügung zu stellen, wurden Forschungen hinsichtlich der Zellkulturen, der zu ihrer Züchtung verwendeten Nährmedien und der Methode zur Propagierung dieser Zellen unternommen. Diese Versuche zur Optimierung der Urokinasesynthese hatten bisher jedoch nur wenig Erfolg; die hergestellte Urokinasemenge reichte lediglich für Experimentalzwecke aus. Es besteht daher insbesondere die Notwendigkeit, die pro Oberflächeneinheit der Kultur und pro Zeiteinheit erzeugte Menge an Urokinase zu erhöhen, um in diesem fibrinolytischen Enzym ein tatsächlich verfügbares Mittel zur Blutgerinnselbehandlung in der Humanmedizin zu besitzen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht somit darin, eine Methode zu schaffen, mit deren Hilfe die Urokinaseproduktion propagierter Zellkulturen gesteigert wird. Im besonderen soll mit Hilfe der Erfindung die Gewinnung von Urokinase aus einer Zellkultur derart verbessert werden, dass eine wesentlich höhere Ausbeute erzielt wird, ohne dass die Qualität des Produkts darunter leidet.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Urokinase aus einer zusammenhängenden Nierenzellenkultur in einem 0,3 bis 1,2 % Glycin enthaltenden organischen Nährmedium.

Nährmedien sind seit langem bekannt und haben dementsprechend Eingang in das Schrifttum gefunden. Die Medien wurden in Einzelflaschen sowie in Petri-Schalen oder in der unter der Bezeichnung "mass tissue culture propagator" (MTCP) bekannten Zuchtvorrichtung, welche die Erzeugung von Urokinase aus Nierenzellen im Grossmassstab gestattet, eingesetzt. Mit Hilfe des MTCP werden einige der bei der Züchtung von Warmblüterzellen in Flaschen auftretenden Nachteile, hauptsächlich das Erfordernis in r extrem hohen Anzahl von Flaschen für eine im Gross-

maßstab erfolgende Synthese sowie die mit der Verwendung einer derart hohen Flaschenzahl zwangsläufig verbundenen Probleme, überwunden. Der MTCP schafft ferner ein Mittel zur Beibehaltung derselben Bedingungen für alle Zellen in den verschiedenen Einzelschichten und gewährleistet die Einheitlichkeit des pH-Wertes sowie der gelösten Sauerstoff- und Kohlendioxidmenge innerhalb des gesamten Mediums. Der MTCP besteht im wesentlichen aus einem Glasgefäß, welches mehrere übereinander gestapelte flache Glasplatten oder -schalen enthält. Man füllt den Propagator so weit, daß das die gewünschte Anzahl von Zellen enthaltende Medium die Platten bzw. Schalen gerade bedeckt. Die Zellen haften und wachsen an den Platten bzw. Schalen. Man speist ein Kohlendioxid/Luft-Gemisch kontinuierlich ein, um eine Sauerstoff- und pH-Kontrolle an dem bekannten (in der Regel mit Bicarbonat gepufferten) Medium vorzunehmen. Nach Bedarf kann eine mechanische Einrichtung vorgesehen sein, mit deren Hilfe man das Medium über der Zellkultur zirkulieren läßt.

Bei den Syntheseyklen werden die Zellen zuerst im Zellwachstumsmedium bis zum Zusammenwachsen (Konfluenz) kultiviert. Anschließend ersetzt man das Wachstumsmedium vollständig durch ein zweites Medium, welches sich für die Erzeugung von Urokinase aus den in der erwähnten Weise kultivierten Zellen eignet. Auf das letztere Medium bezieht sich die vorliegende Erfindung.

Gemäß einer generellen erfindungsgemäßen Ausführungsform werden Zellen mit bekannter Befähigung zur Bildung von Urokinase in Kunststoff- oder Glaskolben gezüchtet. Anschließend werden die Zellen in ein geeignetes Wachstumsmedium verpflanzt und in einem geschlossenen System nach Spülen des letzteren mit Kohlendioxid bis zu einem pH-Wert von 7,2 bei 37°C inkubiert. Wenn das Konfluenzstadium erreicht ist, werden die Zellen mit gepuffter Kochsalzlösung gewaschen. Die Waschflüssigkeit wird dann durch ein

geeignetes Erhaltungsmedium ersetzt, welches verschiedene zur Erhaltung der Zellen und ihrer Urokinaseproduktion erforderliche Zusätze enthält.

Während sowohl die Kultivierung der Zellen bis zum Konfluenzstadium als auch die Erhaltung ihrer Produktionsfähigkeit in der Literatur beschrieben sind, wurde nunmehr festgestellt, daß sich die Urokinaseproduktion beträchtlich erhöhen läßt, indem man dem Medium pro 100 Volumteile 0,3 bis 1,2 Gewichtsteile Glycin einverleibt. Gewöhnlich produziert die Kultur nach etwa 4 bis 5 Wochen eine in wirtschaftlicher Hinsicht optimale Urokinasemenge. Dies bedeutet, daß die erhaltene Urokinasemenge zwar nicht zwangsläufig der maximal erzielbaren Menge entspricht, jedoch dazu ausreicht, den Nutzeffekt einer weiteren Urokinasesynthese so weit herabzusetzen, daß es lohnender erscheint, von einer frischen Charge einer (zusammenhängenden) Monolayer-Wachstumskultur auszugehen.

Die nachstehenden Beispiele sollen die erfindungsgemäßen Vorteile erläutern, ohne die Erfindung zu beschränken.

B e i s p i e l 1

Menschliche embryonale Nierenzellen, welche in 75 mm-Falcon-Kolben kultiviert wurden, werden in einem Anteil von 5×10^5 Zellen in 40 ml eines Nährmediums verpflanzt, welches aus Parker-Medium (beschrieben im Grand Island's Biological Catalog; GIBCO) besteht und 1 x BME (BME = grundminimale essentielle Vitamine und Aminosäuren; beschrieben *ibid.*) sowie 10 Volumprozent fetales Kalbserum enthält. Nachdem Kohlendioxid zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 eingeleitet wurde, werden die Kolben im geschlossenen System bei 37°C inkubiert. Nach dem Erreichen des Konfluenzstadiums oder der Bildung einer zusammenhängenden einzelligen Schicht (Monolayer) werden die Zellen mit 0,8prozentiger wäßriger Natriumchloridlösung, welche mit Phosphat auf einen pH-Wert von 7,4 abgepuffert ist, ge-

waschen.

Anschließend ersetzt man die Waschflüssigkeit durch das Erhaltungsmedium, welches aus 0,5 Gewichtsprozent Lactalbumin-hydrolysat, verschiedenen Anteilen (Gewicht/Volumen) von menschlichem Serumalbumin (MSA) und 0,1 Gewichtsprozent Glukose in 0,8prozentiger Earle-Lösung (Earle's balanced salt solution) besteht und verschiedene Anteile (in Gewichtsprozent; vgl. Tabelle I) Glycin sowie 0,8 g/Liter Natriumbicarbonat enthält. Tabelle I zeigt die an den angegebenen Tagen erzielten Urokinasetiter pro ml.

T a b e l l e I

| Zusatz | 10.Tag | 19.Tag | 33.Tag | 42.Tag |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 0,5 % MSA | 86 | 195 | 335 | 443 |
| 0,5 % MSA + 0,6 % Glycin | 129 | 264 | 498 | 647 |
| 0,1 % MSA | 80 | 179 | 275 | 396 |
| 0,1 % MSA + 0,6 % Glycin | 145 | 276 | 539 | 671 |
| 0,05 % MSA | 96 | 164 | 309 | 443 |
| 0,05 % MSA + 0,6 % Glycin | 112 | 204 | 362 | 535 |
| 0,05 % MSA | 80 | 157 | 297 | 427 |
| 0,05 % MSA + 0,6 % Glycin | 116 | 213 | 408 | 536 |
| durchschnittliche Erhöhung, % | 52 | 38 | 48 | 40 |

B e i s p i e l 2

Bei einem weiteren Versuch wird die Urokinaseerzeugung nach demselben Nierenzellenkultivierungs- und -waschprozeß wie in Beispiel 1 unter Verwendung von 5 Zellen-Propagierkolben für jeden Zusatzstoffanteil getestet. Das Erhaltungsmedium besteht dabei aus demselben Grund-Nährmedium, enthält jedoch 1 g/Liter Glukose sowie verschiedene Anteile von Glycin. Tabelle II zeigt die Resultate (Mittelwerte aus den 5 Kolben) in Form der Urokinase-CTA^x Einheiten/ml nach einer unterschiedlichen Anzahl von Tagen. Alle Nährmedien enthalten 0,1 Gewichtsprozent (pro Volumen) menschliches Serumalbumin.

^x CTA ist die Einheit der Urokinase-Aktivität, vgl.
Journ. Lab. Clin. Med., Bd. 65, S. 713-731 (Mai 1965)

T a b e l l e II

| | | |
|-----------------|----------|-----------|
| a) Nährmedium*) | 567 nach | 700 nach |
| + 0,6 % Glycin | 27 Tagen | 34 Tagen |
| Nährmedium | 688 nach | 755 nach |
| + 0,9 % Glycin | 27 Tagen | 34 Tagen |
| Nährmedium | 740 nach | 774 nach |
| + 1,2 % Glycin | 27 Tagen | 34 Tagen |
| b) Nährmedium | 357 nach | 512 nach |
| + 0,6 % Glycin | 29 Tagen | 36 Tagen |
| Nährmedium | 377 nach | 579 nach |
| + 0,9 % Glycin | 29 Tagen | 36 Tagen |
| Nährmedium | 589 nach | 721 nach |
| + 1,2 % Glycin | 29 Tagen | 36 Tagen |
| c) Nährmedium | 302 nach | 554 nach |
| + 0,6 % Glycin | 28 Tagen | 36 Tagen |
| Nährmedium | 449 nach | 651 nach |
| + 0,9 % Glycin | 28 Tagen | 36 Tagen |
| d) Nährmedium | 652 nach | 963 nach |
| + 0,6 % Glycin | 27 Tagen | 34 Tagen |
| Nährmedium | 714 nach | 1008 nach |
| + 0,9 % Glycin | 27 Tagen | 34 Tagen |
| Nährmedium | 820 nach | 1155 nach |
| + 1,2 % Glycin | 27 Tagen | 34 Tagen |

*) wie vorstehend beschrieben

B e i s p i e l 3

Während die vorangehenden Beispiele klar die verbesserte Urokinasebildung bei Zugabe verschiedener Glycinmengen zum Erhaltungsmedium zeigen, verdeutlicht dieses Beispiel die besonders günstige Wirkung eines Glycinzusatzes zu allen Kulturen, welche hinsichtlich ihrer Befähigung zur Urokinaseproduktion (Erzeugung von 400 oder weniger CTA-Einheiten von Urokinase innerhalb von 30 Tagen) als gerade noch rentabel anzusehen sind. Es wird dasselbe Nährmedium wie in Beispiel 2 verwendet.

Eine Kultur, welche innerhalb von 30 Tagen mit 0,6 % Glycin

350 Einheiten erzeugt, produziert mit 1 % Glycin 584 Einheiten und mit 1,2 % Glycin 598 Einheiten.

Eine Kultur, welche innerhalb von 35 Tagen mit 0,6 % Glycin 549 Einheiten produziert, erzeugt mit 0,9 % Glycin 748 Einheiten und mit 1,2 % Glycin 1011 Einheiten.

Drei Kulturen (a, b und c) ergeben nach 35 Tagen mit 0,6 %, 0,9 % bzw. 1,2 % Glycin folgende Urokinase-CTA-Einheiten:
a) 473 - 793 - 1011; b) 265 - 469 - 449; c) 309 - 547 - 606.
Zwei weitere Kulturen (d und e) liefern nach 34 Tagen nachstehende Urokinase-CTA-Einheiten: d) 265 - 479 - 661;
e) 265 - 400 - 633.

Beispiel 4

Bei einem weiteren, gemäß Beispiel 1 durchgeführten Versuch wird die günstige Wirkung eines Glycinzusatzes auf die Urokinaseausbeute getestet. Tabelle III zeigt die nach 3, 4 und 5 Wochen erzielten Resultate (in Urokinase-CTA-Einheiten/ml).

Tabelle III

| Tage | 21 | 28 | 35 |
|--------------|-----|-----|-----|
| 0 % Glycin | 59 | 92 | 116 |
| 3,0 % Glycin | 104 | 157 | 158 |
| 6,0 % Glycin | 170 | 264 | 315 |
| 7,0 % Glycin | 234 | 329 | 330 |
| 8,0 % Glycin | 303 | 446 | 419 |
| 9,0 % Glycin | 436 | 487 | 483 |

Eine weitere Erhöhung der Urokinaseausbeute läßt sich nach Bedarf dadurch erzielen, daß man dem glycinhaltigen Erhaltungsmedium eine sehr geringe Menge von Pronase einverleibt. Beispielsweise werden die aus Tabelle IV ersichtlichen Re-

sultate erzielt, wenn man als Erhaltungsmedium das Medium von Beispiel 1 mit einem Zusatz von 0,06 bis 0,13 μg Pronase/ml verwendet.

T a b e l l e IV

| Zusatz | 8.Tag | 15.Tag | 22.Tag | 29.Tag | 36.Tag |
|------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Vergleichsprobe | 118 | 222 | 378 | 541 | 632 |
| 0,06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 226 | 533 | 606 | 950 | 965 |
| 0,13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 261 | 400 | 574 | 973 | 927 |

Eine weitere Verbesserung wird außerdem erzielt, wenn man die Pronase erst am 9. Tag des Produktionszyklus zusetzt. Das Vergleichsmedium von Beispiel 1 liefert am 10. bzw. 17. Tag Urokinasetiter von 298/ml bzw. 490/ml. Bei Verwendung von 0,5 μg Pronase/ml Medium betragen diese Titer 508/ml bzw. 792/ml.

Man erkennt aus den vorangehenden Beispielen, daß die Wirkung von Glycin sehr ausgeprägt ist. Sie ermöglicht es, zur Herstellung von Urokinase Zellkulturen zu verwenden, welche an sich als gerade noch rentabel anzusehen sind. Jedoch auch bei optimalen Zellkulturen läßt sich die Ausbeute stark erhöhen. Es wird eine 50- bis 600prozentige Ausbeutesteigerung erzielt, bezogen auf jenen Wert, der bei Verwendung desselben, jedoch keinen Glycinzusatz enthaltenden Nähr- oder Erhaltungsmediums zu erwarten ist.

Es ist überraschend, daß eine spezielle Aminosäure in einem bestimmten Mengenbereich zu den vorgenannten ausgezeichneten und unerwarteten Resultaten führt. Glycin ist die einfachste und verbreitetste Aminosäure. Obwohl ferner bereits die üblicherweise den Produktionsmedien für Nierenzellen einverleibten Aminosäure-Zusätze geringe Mengen bestimmter Aminosäuren enthalten, ist festzustellen, daß die erfindungsgemäß verwendeten Anteile im Bereich des 100fachen der herkömmlich eingesetzten Mengen liegen. Überraschenderweise wurde weiterhin gefunden, daß sich unbegrenzte Glycinmengen nicht günstig auswirken und daß

der optimale Anteil des Zusatzstoffes im Bereich von 0,3 bis 1,2 Volumprozent des Produktions-Nährmediums liegt. Anteile von weniger als 0,3 % führen zu einer sehr geringen, vom wirtschaftlichen Standpunkt jedoch immer noch relevanten Steigerung der Urokinasebildung, auf welche sich Anteile von mehr als 1,2 Volumprozent andererseits schädlich auswirken. Überraschend ist außerdem, daß die einfachste existierende Aminosäure die beschriebene, ausgeprägte Wirkung auf die Urokinaseproduktion besitzt. Andere Aminosäuren, die in mit den erfindungsgemäß eingesetzten Anteilen vergleichbaren Mengen verwendet wurden, zeigten keine oder zuweilen sogar entgegengesetzte Wirkungen auf die Urokinaseproduktion.

Wie erwähnt, werden die besten Ergebnisse erzielt, wenn man zur Urokinaseerzeugung eine an einer festen Oberfläche haftende, zusammenhängende einschichtige Zellstruktur verwendet. Derartige Monolayer-Strukturen wurden bereits bei früheren Forschungen verwendet und sind in der Literatur beschrieben. Die optimale Temperatur für die erfindungsgemäße Urokinaseerzeugung beträgt $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Bei darunterliegenden Temperaturen erfolgt die Urokinasebildung nicht mit optimaler Geschwindigkeit, während bei höheren Temperaturen die Gefahr einer Schädigung der Urokinase erzeugenden Zellen so stark in den Vordergrund tritt, daß der Erfolg der Synthese in Frage gestellt wird.

Wie der mit der Technik der Erhaltung lebender Zellen in einem Nährmedium vertraute Fachmann erkennen wird, läßt sich die vorgenannte günstige Wirkung mit beliebigen Arten von Nährmedien für Nierenzellen erzielen. Diese Medien können verschiedene Anteile von Mineralstoffen und/oder Vitaminen, Puffern u.a. enthalten sowie unterschiedliche Konzentrationen an den Bestandteilen aufweisen. Beispiele für derartige Komponenten sind die gebräuchliche Earle-Lösung, Natriumbicarbonat sowie andere übliche Zusätze für zum vorgenannten Zweck verwendet Nährmedien.

P a t e n t a n s p r ü c h e

2551017

1. Verfahren zur Herstellung von Urokinase aus einer zusammenhängenden Kultur von lebenden Nierenzellen in einem wäßrigen Nährmedium, welches außer den üblichen Zellkultur-Erhaltungszusätzen pro 100 Volumteile 0,3 bis 1,2 Gewichtsteile Glycin enthält.
 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Glycin in einem Anteil von 0,6 bis 1,2 Gewichtsteilen eingesetzt wird.
 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Nährmedium zusätzlich pro 100 g 6 bis 50 μ g Pronase enthält.
 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Pronase in einem Anteil von 6 bis 20 μ g eingesetzt wird.
 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Nährmedium pro 100 Gewichtsteile 0,6 bis 1,2 Gewichtsteile Glycin sowie 6×10^{-6} bis 20×10^{-6} Gewichtsteile Pronase enthält.
- - - - -